



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 42 24 542 A 1**

51 Int. Cl.⁵:
C 07 K 15/28
A 61 K 39/395

21 Aktenzeichen: P 42 24 542.7
22 Anmeldetag: 24. 7. 92
43 Offenlegungstag: 27. 1. 94

DE 42 24 542 A 1

71 Anmelder:

Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

74 Vertreter:

Deufel, P., Dipl.-Wirtsch.-Ing.Dr.rer.nat.; Hertel, W.,
Dipl.-Phys.; Rutetzki, A., Dipl.-Ing.Univ.; Rucker, E.,
Dipl.-Chem. Univ. Dr.rer.nat.; Huber, B., Dipl.-Biol.
Dr.rer.nat.; Becker, E., Dr.rer.nat., 80331 München;
Kurig, T., Dipl.-Phys., 83022 Rosenheim; Steil, C.,
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 80331 München

72 Erfinder:

Hämmerling, Günter, Prof. Dr., 6900 Heidelberg, DE

54 Verfahren zur Herstellung von monoklonalen MHC Klasse I-puls-Peptid-restringierten Antikörpern

57 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen MHC Klasse I-plus-Peptid-restringierten Antikörpern, das durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:

- (a) Isolierung von unbeladenen MHC Klasse I-Molekülen,
- (b) Einführung eines ein solches Molekül von (a) codierendes Gen in das Genom einer Maus zur Expression des Gens,
- (c) Beladung eines Moleküls von (a) mit einem Antigen zur Ausbildung eines MHC Klasse I-plus-Peptid-Moleküls,
- (d) Immunisierung der transformierten Maus von (b) mit dem beladenen Molekül von (c),
- (e) Isolierung von Milzzellen aus der immunisierten Maus von (d) und Herstellung von monoklonalen MHC Klasse I-plus-Peptid-restringierten Antikörpern sowie gegebenenfalls deren Humanisierung nach üblichen Verfahren.

DE 42 24 542 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 11. 93 308 064/314

3/55

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Herstellung von monoklonalen MHC Klasse I-plus-Peptid-restringierten Antikörpern und deren Verwendung.

Es ist bekannt, daß zytotoxische T Lymphozyten Peptide erkennen, die von MHC (Major Histocompatibility Complex) Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese Peptide stammen von intrazellulär synthetisierten Proteinen, z. B. von Tumorantigenen oder viralen Proteinen. Damit ist gewährleistet, daß zytotoxische T Lymphozyten körperfremde Substanzen erkennen können, die ausschließlich intrazellulär exprimiert werden und sich somit der Entdeckung durch Antikörper entziehen.

Auf dieser Erkenntnis beruht ein immunologischer Ansatz der Tumorthherapie. Es wird versucht, tumorspezifische-zytotoxische T Lymphozyten eines Patienten in vitro herzustellen oder aus dem Tumor zu isolieren, diese in vitro in großem Maßstab zu vermehren, um dann den Patienten mit seinen eigenen tumorspezifischen-zytotoxischen T Lymphozyten zu behandeln.

Dieses Verfahren ist jedoch technisch äußerst aufwendig und kann daher nur in ganz begrenztem Umfang durchgeführt werden. Wünschenswert wären Antikörper, die die gleiche Spezifität wie tumorspezifische-zytotoxische T Lymphozyten aufweisen, d. h. syngenes MHC Klasse I-plus-Peptid erkennen.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem solche Antikörper hergestellt werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch folgende Schritte erreicht:

- a) Isolierung von unbeladenen MHC Klasse I-Molekülen,
- b) Einführung eines ein solches Molekül von (a) codierendes Gen in das Genom einer Maus zur Expression des Gens,
- c) Beladung eines Moleküls von (a) mit einem Antigen zur Ausbildung eines MHC Klasse I-plus-Peptid-Moleküls,
- d) Immunisierung der transformierten Maus von (b) mit dem beladenen Molekül von (c),
- e) Isolierung von Milzzellen aus der immunisierten Maus von (d) und Herstellung von monoklonalen MHC Klasse I-plus-Peptid-restringierten Antikörpern sowie gegebenenfalls deren Humanisierung nach üblichen Verfahren.

Der Ausdruck "MHC" umfaßt den Ausdruck "HLA".

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf dem Prinzip, daß ein Organismus in der Regel nur gegen fremde Antigene spezifische Antikörper produziert.

Erfindungsgemäß werden unbeladene MHC Klasse I-Moleküle isoliert. Dies können Zellen selbst sein, die einen Defekt in den MHC codierten Transportern haben und daher ihre MHC-Moleküle nicht mit Peptid beladen können. Solche Zellen sind beispielsweise die RMA-S Tumorzellen der CS7 BL/6 Maus oder die T2 genannten EBV transformierten Zellen des Menschen.

Unbeladene MHC Klasse I-Moleküle können ferner über bekannte biochemische Verfahren aus Geweben isoliert werden. Sie können aber auch mittels DNA-Rekombinationstechniken erhalten werden. Ihre Gene können beispielsweise in E. coli oder im Baculovirus-System exprimiert werden.

Erfindungsgemäß werden die Gene von MHC Klasse

I-Molekülen auch in das Genom einer Maus zur Expression der Gene eingeführt. Hierfür können übliche, dem Fachmann bekannte Verfahren verwendet werden. Durch die Transformation einer Maus mit einem MHC Klasse I-Gen und dessen Expression wird erreicht, daß diese Maus das spezielle MHC Klasse I-Molekül nicht als fremd ansieht und somit auch keine dagegen gerichtete Antikörperproduktion in Gang setzt.

Eine solche Transformation kann unterbleiben, wenn das MHC Klasse I-Molekül ursprünglich aus der zu transformierenden Maus, wie im Falle der RMA-S Tumorzellen aus der CS7 BL/6 Maus, vgl. vorstehend, oder einer syngenen Maus stammt. Eine Antikörperproduktion gegen das Molekül würde dann nicht stattfinden.

Eine solche tritt jedoch in jedem Fall ein und ist erfindungsgemäß gewünscht, wenn das verwendete MHC Klasse I-Molekül mit einem Antigen beladen ist. Die Antikörper richten sich dann gegen das von dem MHC Klasse I-Molekül und dem Antigen gebildete Epitop, d. h. es entstehen gegen MHC Klasse I-plus-Peptid-gerichtete Antikörper.

Die Beladung von MHC Klasse I-Molekülen erfolgt erfindungsgemäß nach bekannten Verfahren. Zur Beladung können Antigene unterschiedlichster Natur, insbesondere Virus- und Tumorantigene verwendet werden. Beispiele für Tumorantigene sind das aus menschlichen Melanomen isolierte Antigen (MAGE-1) und das von dem E6 bzw. E7 Onkogen des HPV produzierte Tumorantigen. Die Immunisierung der Maus mit den beladenen MHC Klasse I-Molekülen erfolgt ebenfalls nach bekannten Verfahren.

Erfindungsgemäß wird der immunisierten Maus nach üblicher Zeit die Milz zur Herstellung von monoklonalen MHC Klasse I-plus-Peptid-restringierten Antikörpern entnommen. Hierfür werden übliche dem Fachmann bekannte Verfahren angewandt.

Denkbar ist es allerdings auch, daß der immunisierten Maus polyklonale MHC Klasse I-plus-Peptid-restringierte Antikörper entnommen und diese gemäß bekannten Verfahren hochgereinigt werden.

Erfindungsgemäß werden also sowohl monoklonale als auch polyklonale MHC Klasse I-plus-Peptid-restringierte Antikörper bereitgestellt. Diese können gegebenenfalls durch bekannte Verfahren humanisiert werden. Sie eignen sich dann nicht nur zur Diagnose sondern auch zur Therapie von Tumoren und Infektionen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht es weiterhin, MHC Klasse II-plus-Peptid-restringierte Antikörper herzustellen. Diese können ebenfalls poly- bzw. monoklonal sein. Auch können sie humanisiert werden. Sie stellen dann eine Behandlungsmöglichkeit für Autoimmunerkrankungen dar.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von monoklonalen MHC Klasse I-plus-Peptid-restringierten Antikörpern, gekennzeichnet durch folgende Schritte:

- a) Isolierung von unbeladenen MHC Klasse I-Molekülen,
- b) Einführung eines ein solches Molekül von (a) codierendes Gen in das Genom einer Maus zur Expression des Gens,
- c) Beladung eines Moleküls von (a) mit einem Antigen zur Ausbildung eines MHC Klasse I-plus-Peptid-Moleküls,
- d) Immunisierung der transformierten Maus von (b) mit dem beladenen Molekül von (c),

e) Isolierung von Milzzellen aus der immunisierten Maus von (d) und Herstellung von monoklonalen MHC Klasse I-plus-Peptid-restringierten Antikörpern sowie gegebenenfalls deren Humanisierung nach üblichen Verfahren. 5

2. Monoklonale MHC Klasse I-plus-Peptid-restringierte Antikörper nach dem Verfahren nach Anspruch 1.

3. Verwendung der monoklonalen MHC Klasse I-plus-Peptidrestringierten Antikörper nach dem Verfahren nach Anspruch 1 zur Diagnose und Therapie von Tumoren und Infektionen. 10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -